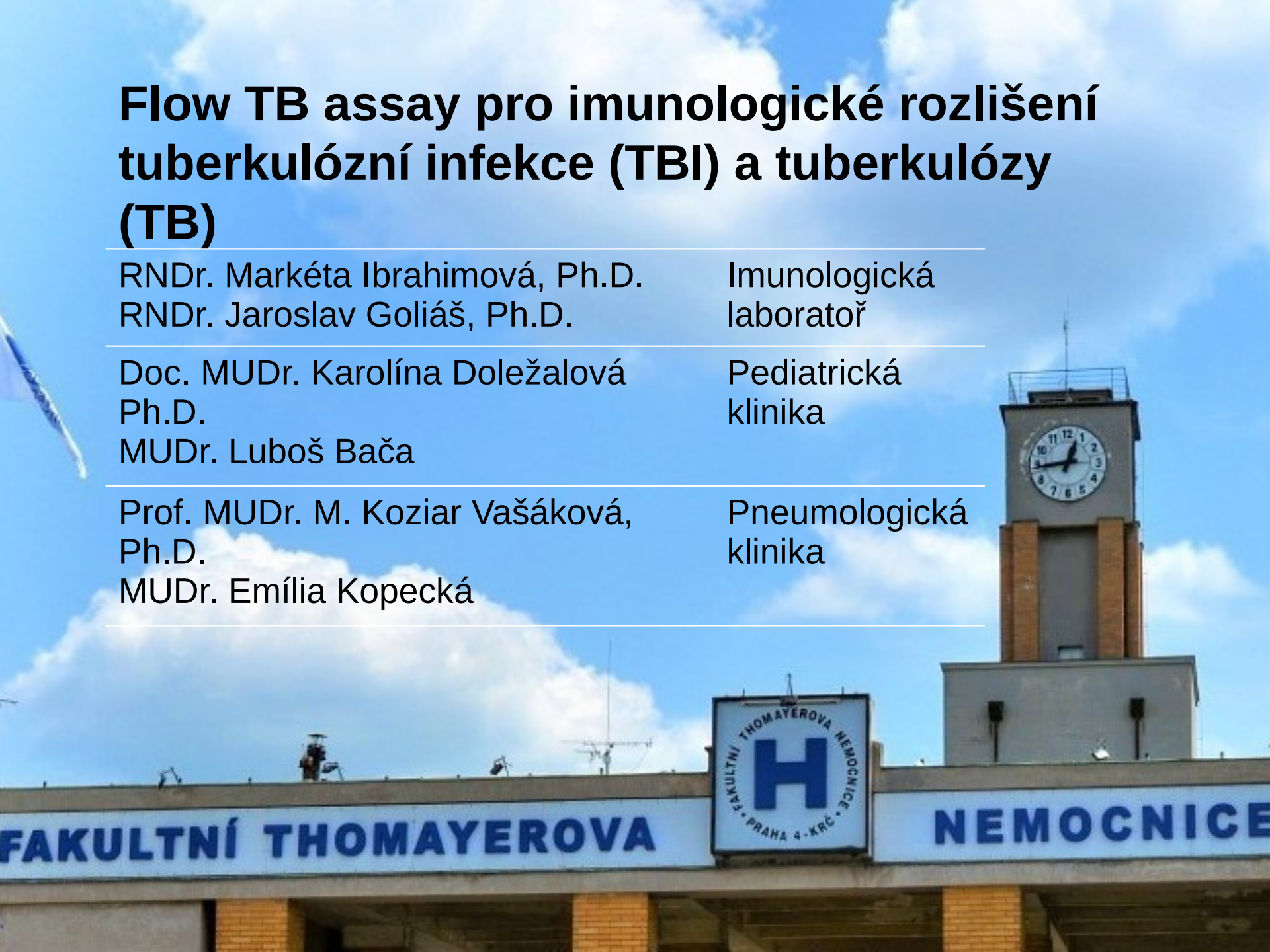
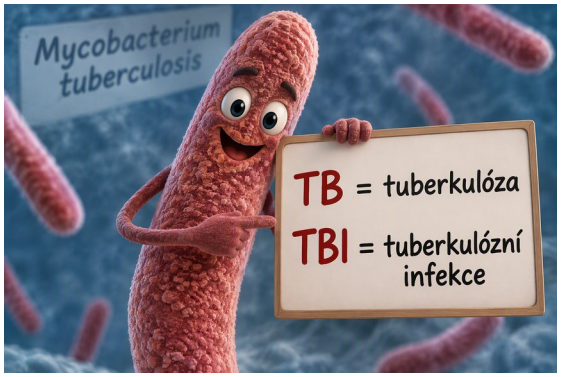
Flow TB assay pro imunologické rozlišení tuberkulózní infekce (TBI) a tuberkulózy (TB)

RNDr. Markéta Ibrahimová, Ph.D. RNDr. Jaroslav Goliáš, Ph.D.	Imunologická laboratoř
Doc. MUDr. Karolína Doležalová Ph.D. MUDr. Luboš Bača	Pediatrická klinika
Prof. MUDr. M. Koziar Vašáková, Ph.D. MUDr. Emília Kopecká	Pneumologická klinika

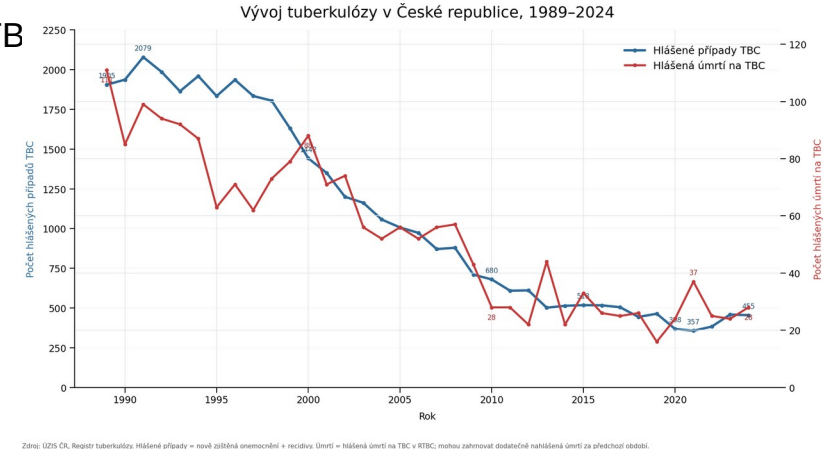


Tuberkulóza – úvod, důvod

- tuberkulóza (**TB**) – nakažlivé bakteriální onemocnění způsobené *Mycobacterium tuberculosis (Mbt)*
  - hlavní příčina úmrtí spojená s TB-MDR a koinfekcí s HIV
- tuberkulózní infekce (**TBI**) - dříve nazývaná latentní tuberkulóza
  - ¼ celosvětové populace



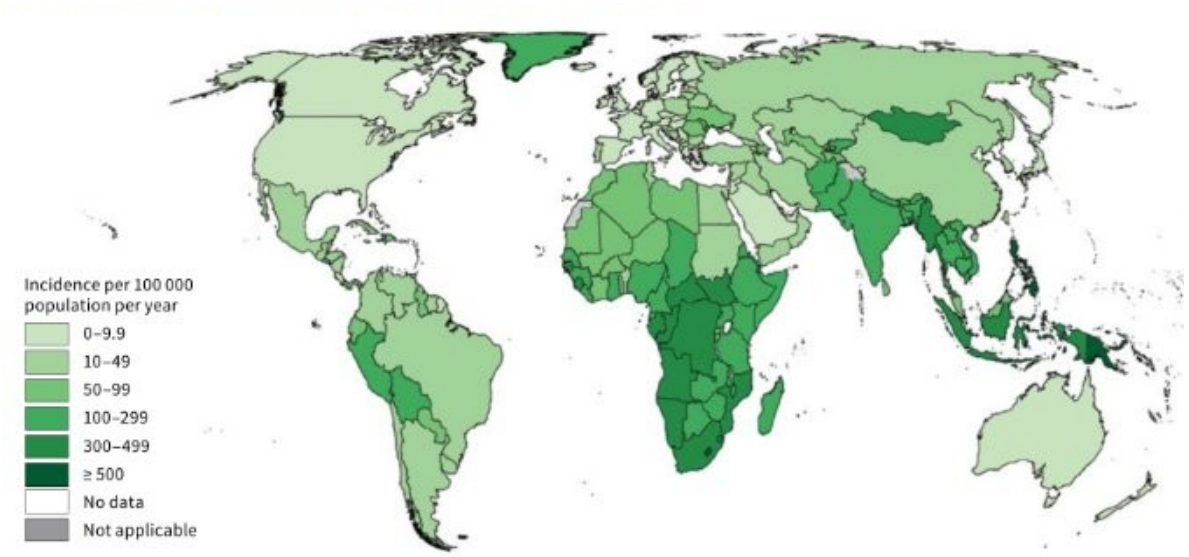
- ČR patří dlouhodobě mezi země s nejnižším výskytem TB
- 2010 ukončeno plošné očkování novorozenců
- situace v **ČR** dle ÚZIS (za rok 2025):
  - 429 nových případů (15 dětí)
  - 15 úmrtí
  - 24 případů MDR-TB



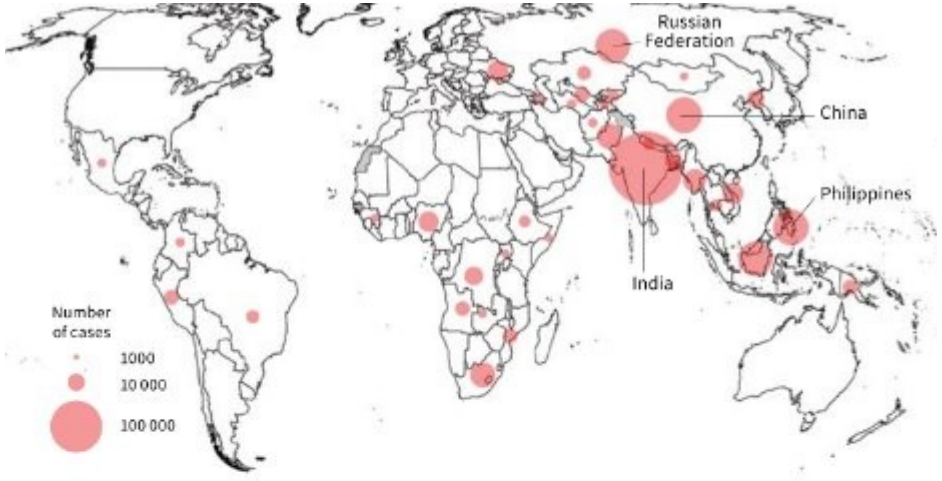
- situace ve světě dle **WHO** (za rok 2024):
  - 10,7 mil. nových onemocnění TB (1,3 mil dětí)
  - 1,23 mil. úmrtí
  - 390 tis. nových případů rifampicin-rezistentní TB

WHO Global tuberculosis report 2025, ÚZIS ČR

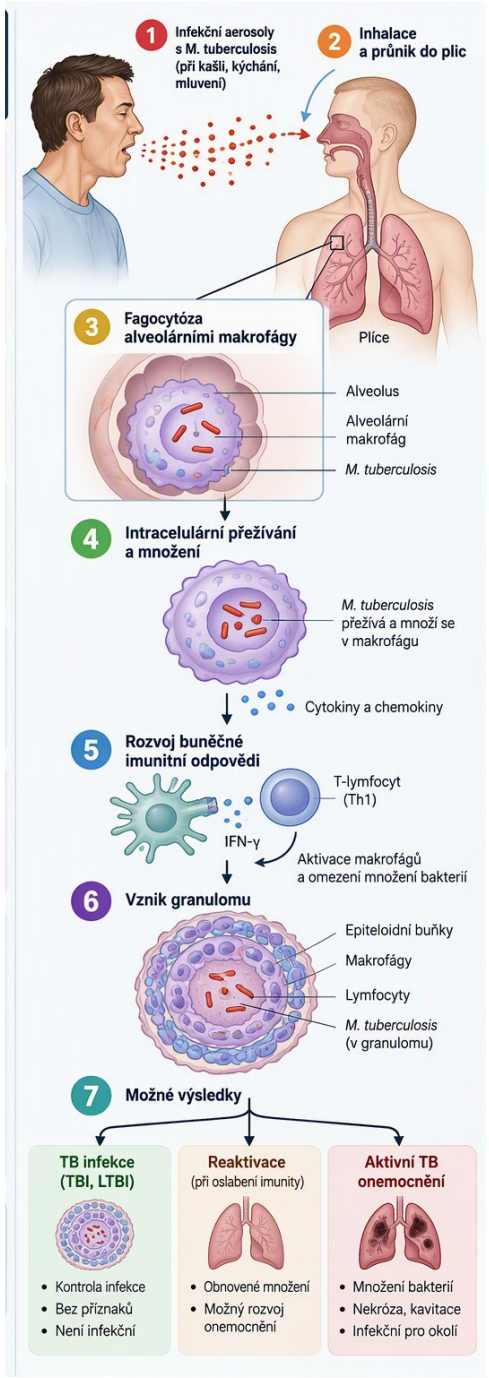
Tuberkulóza – incidence v roce 2024



Tuberkulóza – MDR/RR-TB v roce 2024



WHO Global tuberculosis report 2025



Tuberkulóza – mechanizmus infekce

- infekce se šíří kapénkami, komunitní šíření
- vdechnutím kapének se bakterie dostanou do plic (alveolů)

- *Mbt* fagocytována alveolárními makrofágy, kde mohou přežívat

- aktivace imunitní odpovědi (cytokiny, Th1 odpověď) a tvorba granulomů (epiteloidní buňky, lymfocyty, makrofágy)

⇒ TBI

- rozpad granulomů – nekróza a kavitace
- další šíření - primárně plíce, ale mohou se šířit do dalších tkání a orgánů

=> TB

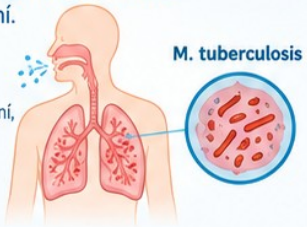
Jen 5-10% TBI progreduje do TB, typicky do 1-3 let!!!

Obrázky: MS Copilot Chat

Tuberkulóza – diagnostika

Aktivní tuberkulóza (onemocnění)

Cílem diagnostiky je prokázat přítomnost *M. tuberculosis* v organismu a posoudit rozsah onemocnění.



1 Klinické podezření

- příznaky: kašel > 2–3 týdny, horečky, noční pocení, úbytek hmotnosti, únava
- rizikové faktory: kontakt s TB, imunosuprese, cestování do endemických oblastí

2 Základní vyšetření



Mikrobiologie
- AFB v nátěru (Ziehl-Neelsen, LED)
- kultivace (nejvyšší senzitivita)
- NAAT/PCR (rychlá diagnostika, detekce rezistence)



Zobrazovací metody
- RTG hrudníku (infiltráty, kaverny, uzliny)
- CT (nejasné nálezy, komplikace)



Laboratorní testy
- CRP, FW
- krevní obraz
- jaterní testy (před léčbou)

3 Další vyšetření (podle situace)

- bronchoskopie s BAL (při negativních vzorcích)
- biopsie (extrapulmonální forma)
- testy na HIV a jiné komorbidity

Latentní tuberkulózní infekce (TBI)

Cílem diagnostiky je zjistit, zda se osoba setkala s *M. tuberculosis* (bez známek aktivního onemocnění).

1 Klinické podezření

- **asymptomatická forma** (většinou bez příznaků)
- **rizikové faktory**: kontakt s TB, původ z vysoce rizikových zemí, imunosuprese, plánovaná biologická léčba

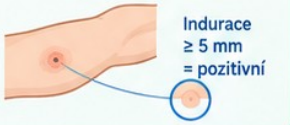


2 Imunologické testy (prokázání senzibilizace)

IGRA (interferon-gamma release assay)
- QuantiFERON-TB Gold Plus (ELISA/ChLIA)
- T-SPOT.TB (ELISPOT)
- měří IFN-γ po stimulaci specifickými antigény (ESAT-6, CFP-10, TB7.7)



TST (tuberkulinový kožní test)
- intradermální aplikace tuberkulinu
- hodnocení po 48–72 hodinách (indurace ≥ 5 mm pozitivní, dle rizikových skupin)



3 Interpretace

Pozitivní IGRA / TST
- pravděpodobná TBI (ne vždy znamená, že se infekce jistě stala; může být zkřížená reaktivita)

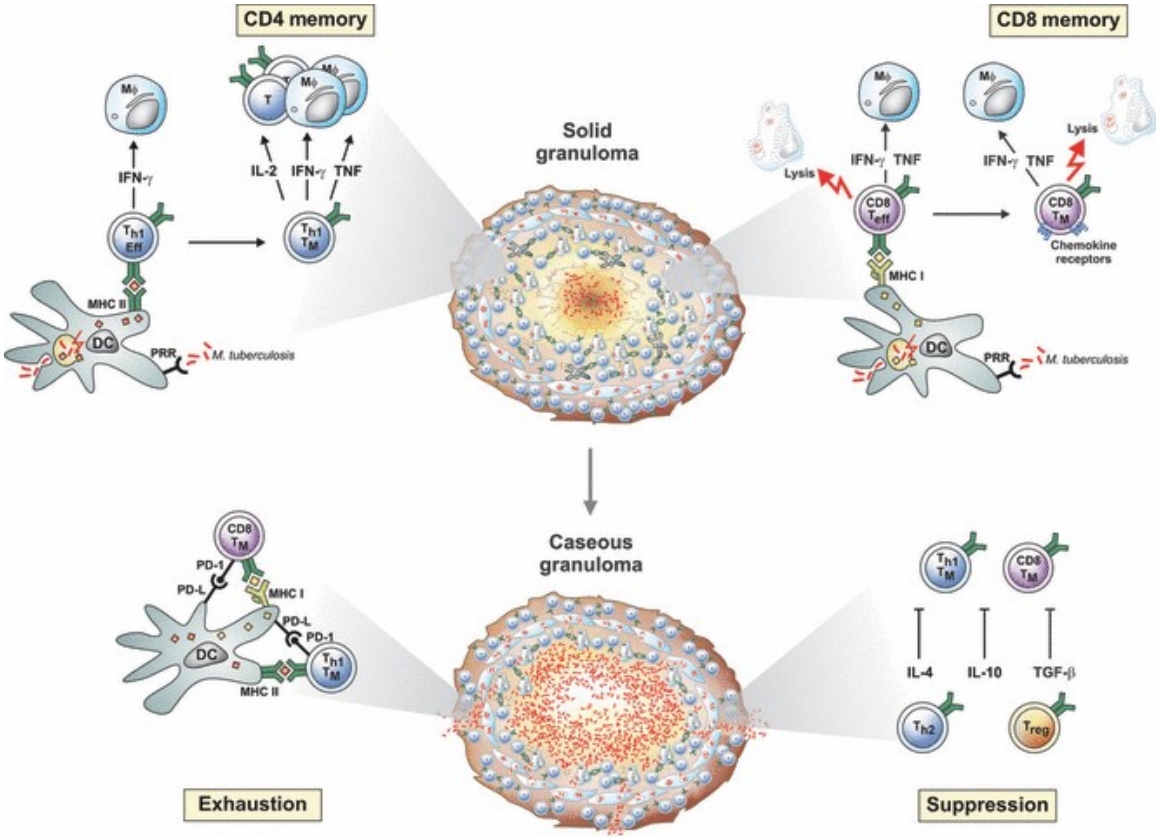
Negativní IGRA / TST
- infekce nepravděpodobná
- u imunokompromitovaných může být falešně negativní

Pozitivní IGRA nebo TST svědčí pro imunologickou senzibilizaci vůči *Mtb*, ale samy o sobě nerozliší infekci od aktivního onemocnění.

Obrázky: ChatGPT

Role T lymfocytů a cytokinů ve formování a údržbě granulomů

- rozlišení spící TBI od probouzející se TB je nezbytné pro podání cílené léčby a zastavení procesu

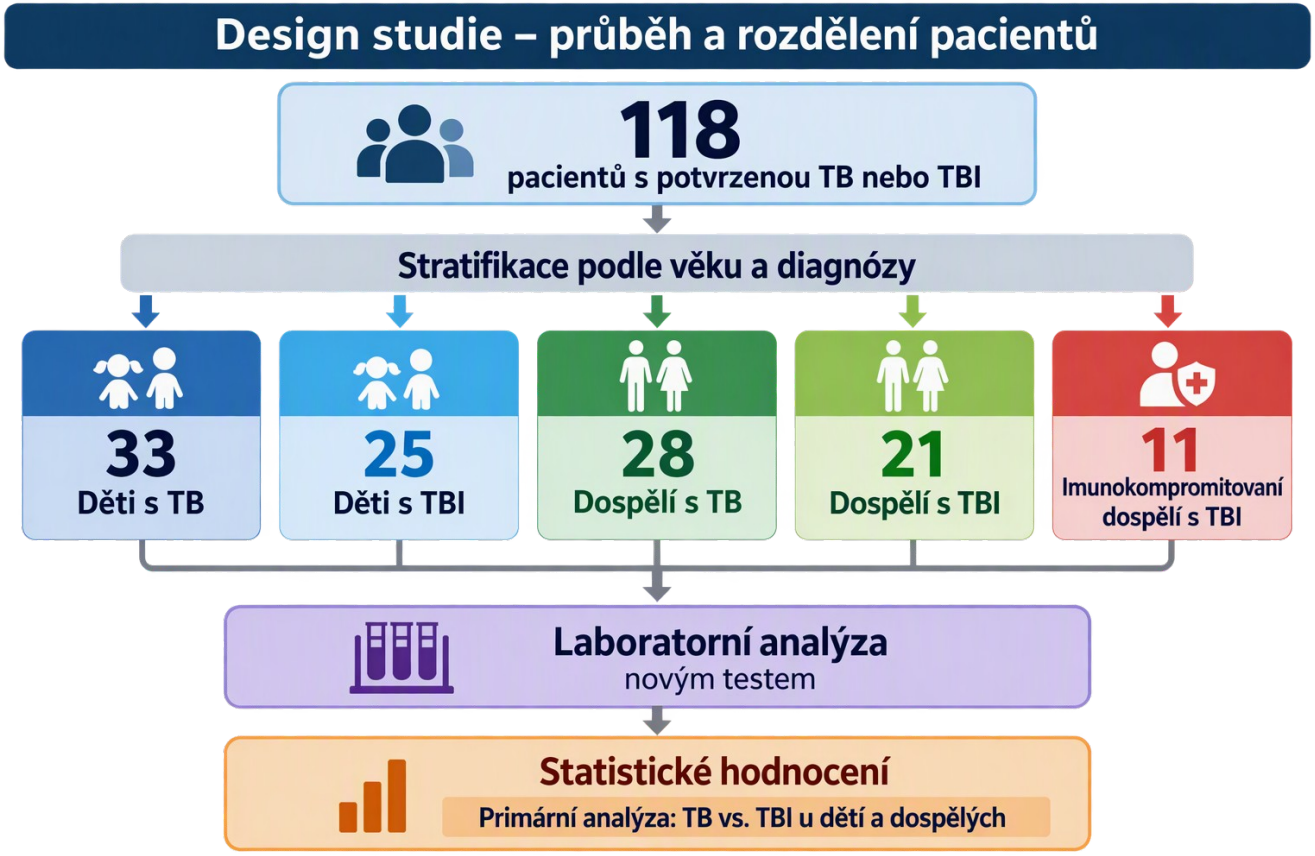


- potřeba nového laboratorního testu zejména pro zranitelné skupiny jako jsou děti, imunokompromitované osob a pacienti na biologické léčbě

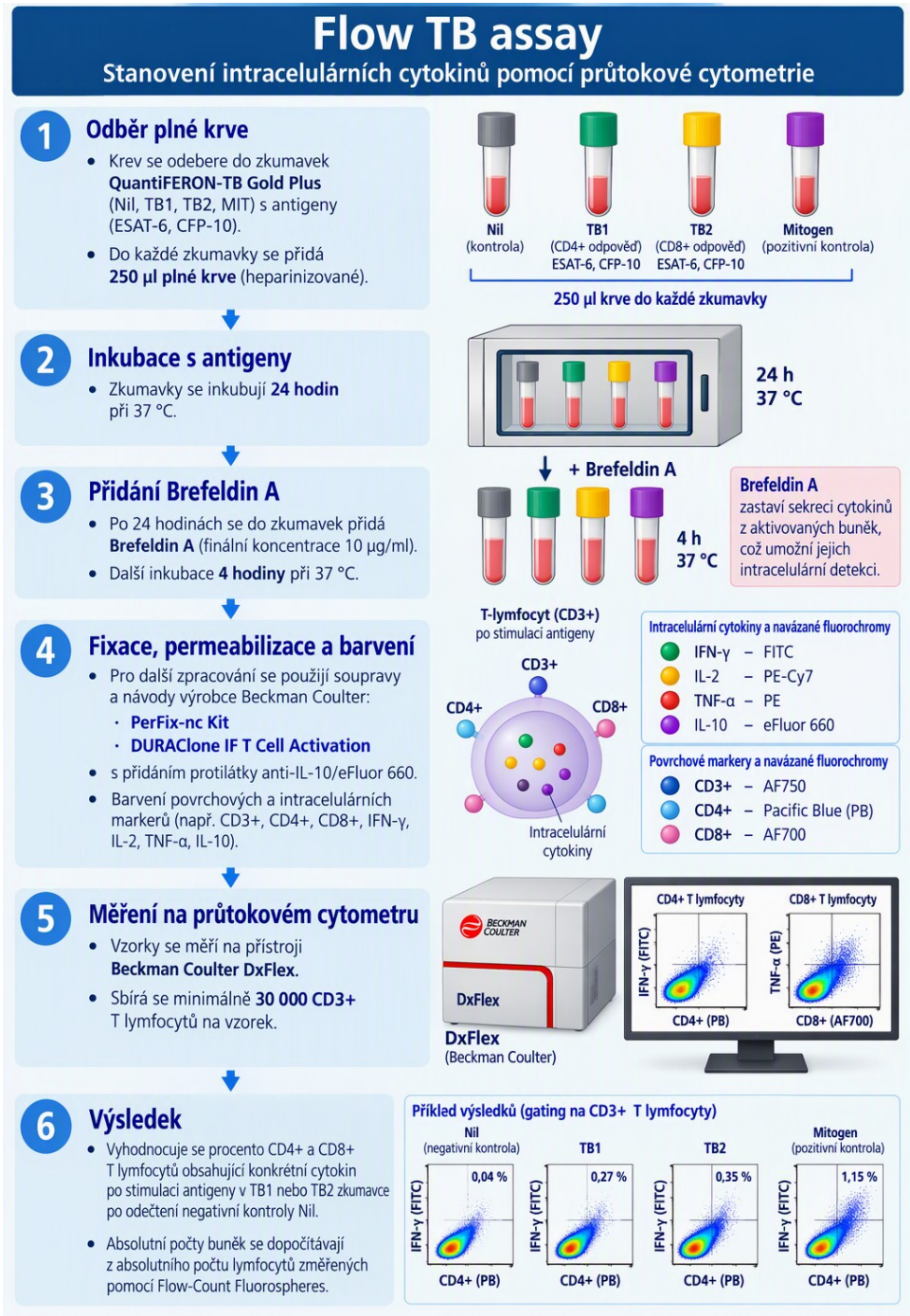
Kaufmann SH. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. J Intern Med. 2010 Apr;267(4):337-53.

Flow TB assay – studie 2024 - 2025

Nový metoda pro rozlišení mezi TB a TBI založená na průtokové cytometrii, která měří produkci intracelulárních cytokinů (IL-2, IL-10, IFNγ, TNFα) v CD4+ a CD8+ T lymfocytech u jedinců infikovaných *Mbt* s pozitivním IGRA testem stratifikovaným podle věku, typu onemocnění a komorbidity

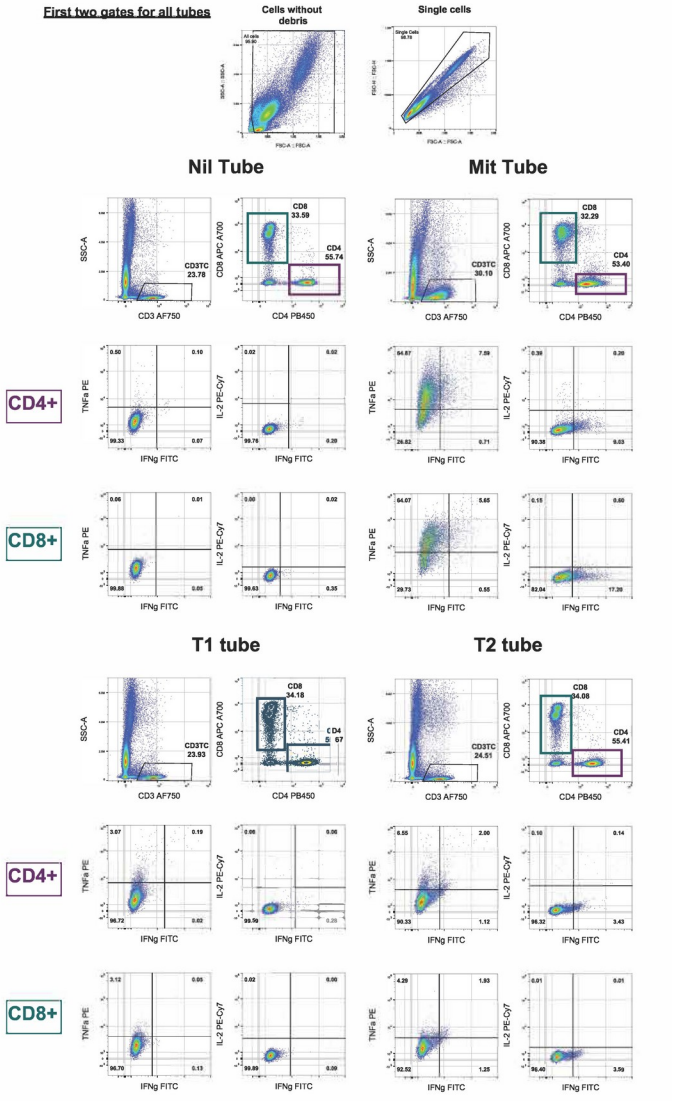


Metodika



Obrázky: MS Copilot Chat

Flow TB assay – analýza a statistika



Patient	Stimulant	T cells population	Cytokine(s) produced	Median (Min-Max Ranges) (cells/µl)			Wilcoxon / Kruskal-Wallis Test p-Value	p-Value NI vs. TBI	p-Value NI vs. TB	p-Value TBI vs. TB
				NI	TBI	TB				
Adult	(Tube TB1)	CD4+	TNFα	**0.025** (0.000-0.643)	**2.213** (0.000-6.021)	**0.416** (0.000-11.917)	0.0093	0.0032	0.3715	0.7495
			IFNγ	**0.054** (0.000-4.586)	**0.026** (0.000-4.386)	**0.008** (0.000-0.050)	0.2144	-	-	-
			IL-2	**0.000** (0.000-0.096)	**0.005** (0.000-0.024)	**0.000** (0.000-0.028)	0.7278	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**0.003** (0.000-2.546)	**0.020** (0.000-2.635)	**0.000** (0.000-0.037)	0.2315	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.003** (0.000-2.148)	**0.000** (0.000-2.604)	**0.000** (0.000-0.227)	0.6815	-	-	-
		CD8+	TNFα	**0.022** (0.000-0.985)	**0.250** (0.000-2.848)	**0.078** (0.000-10.306)	0.3049	-	-	-
			IFNγ	**0.017** (0.000-2.498)	**0.016** (0.000-3.066)	**0.007** (0.000-0.063)	0.2709	-	-	-
			IL-2	**0.008** (0.000-0.194)	**0.000** (0.000-0.296)	**0.000** (0.000-0.174)	0.5216	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**0.003** (0.000-0.444)	**0.004** (0.000-0.021)	**0.000** (0.000-0.016)	0.0353	0.9964	0.0312	0.0930
			IL-2/IFNγ	**0.000** (0.000-0.643)	**0.000** (0.000-0.065)	**0.000** (0.000-0.016)	0.6416	-	-	-
	(Tube TB2)	CD4+	TNFα	**0.016** (0.000-6.587)	**1.294** (0.000-8.077)	**0.420** (0.000-9.664)	0.2312	-	-	-
			IFNγ	**0.012** (0.000-5.852)	**0.036** (0.000-1.135)	**0.009** (0.000-0.028)	0.6421	-	-	-
			IL-2	**0.000** (0.000-0.064)	**0.000** (0.000-0.080)	**0.012** (0.000-0.093)	0.0234	0.5773	0.0973	0.0553
			TNFα/IFNγ	**0.002** (0.000-3.378)	**0.012** (0.000-0.350)	**0.000** (0.000-0.084)	0.5707	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.002** (0.000-3.378)	**0.005** (0.000-0.335)	**0.000** (0.000-0.385)	0.9384	-	-	-
		CD8+	TNFα	**0.028** (0.000-15.655)	**0.061** (0.000-7.805)	**0.064** (0.000-15.446)	0.8869	-	-	-
			IFNγ	**0.007** (0.000-3.117)	**0.004** (0.000-0.736)	**0.000** (0.000-0.141)	0.3907	-	-	-
			IL-2	**0.007** (0.000-0.407)	**0.000** (0.000-0.165)	**0.023** (0.000-0.139)	0.6244	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**0.000** (0.000-0.557)	**0.002** (0.000-0.006)	**0.000** (0.000-0.043)	0.7336	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.000** (0.000-0.997)	**0.000** (0.000-0.035)	**0.000** (0.000-0.014)	0.6503	-	-	-
	(Tube Mit)	CD4+	TNFα	**47.811** (23.746-101.462)	**75.519** (43.666-121.442)	**56.602** (33.967-178.149)	0.1591	-	-	-
			IFNγ	**5.458** (2.179-11.781)	**9.400** (2.315-19.390)	**5.935** (2.286-16.063)	0.1573	-	-	-
			IL-2	**2.482** (0.874-4.483)	**2.534** (1.355-4.825)	**1.482** (0.484-5.577)	0.0607	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**5.673** (2.105-15.191)	**10.448** (2.301-18.913)	**5.825** (2.291-16.427)	0.1767	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**10.326** (0.238-18.207)	**18.150** (0.452-34.388)	**9.603** (6.417-27.350)	0.0533	-	-	-
		CD8+	TNFα	**22.585** (12.015-66.958)	**32.657** (9.676-42.096)	**31.216** (11.932-59.610)	0.9424	-	-	-
			IFNγ	**6.353** (2.329-27.534)	**8.179** (1.146-25.654)	**5.882** (2.649-14.702)	0.3219	-	-	-
			IL-2	**0.258** (0.081-1.738)	**0.194** (0.035-0.915)	**0.413** (0.000-1.753)	0.2300	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**0.590** (0.098-12.247)	**0.620** (0.287-1.186)	**0.347** (0.132-1.270)	0.1131	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.419** (0.089-3.092)	**0.400** (0.017-0.853)	**0.446** (0.054-2.692)	0.8520	-	-	-
Children	(Tube TB1)	CD4+	TNFα	**0.022** (0.000-0.548)	**1.163** (0.183-8.199)	**2.648** (0.537-10,319)	< 0.0001	0.0022	< 0.0001	0.5682
			IFNγ	**0.000** (0.000-5.200)	**0.061** (0.000-3.738)	**0.034** (0.000-9.877)	0.2463	-	-	-
			IL-2	**0.007** (0.000-0.078)	**0.009** (0.000-0.192)	**0.040** (0.000-0.126)	0.0162	0.9362	0.0288	0.0855
			TNFα/IFNγ	**0.000** (0.000-0.477)	**0.047** (0.009-3.503)	**0.036** (0.000-7.679)	0.0324	0.0323	0.1525	0.7534
			IL-2/IFNγ	**0.000** (0.000-0.048)	**0.012** (0.000-0.404)	**0.042** (0.000-1.114)	0.0058	0.0891	0.0067	0.6033
		CD8+	TNFα	**0.000** (0.000-0.549)	**0.176** (0.046-1.888)	**1.059** (0.128-4.113)	< 0.0001	0.0222	0.0002	0.0807
			IFNγ	**0.000** (0.000-2.395)	**0.041** (0.004-2.255)	**0.000** (0.000-3.675)	0.0751	-	-	-
			IL-2	**0.000** (0.000-0.127)	**0.000** (0.000-0.005)	**0.017** (0.000-0.063)	0.0484	0.1513	0.8782	0.0367
			TNFα/IFNγ	**0.000** (0.000-0.226)	**0.009** (0.000-3.029)	**0.000** (0.000-3.023)	0.2050	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.000** (0.000-0.060)	**0.000** (0.000-0.214)	**0.006** (0.000-0.549)	0.4073	-	-	-
	(Tube TB2)	CD4+	TNFα	**0.024** (0.000-0.702)	**1.887** (0.185-7.557)	**3.082** (0.875-9.828)	< 0.0001	0.0014	< 0.0001	0.5307
			IFNγ	**0.000** (0.000-0.312)	**0.000** (0.000-0.326)	**0.015** (0.000-9.052)	0.2004	-	-	-
			IL-2	**0.000** (0.000-0.024)	**0.023** (0.000-0.212)	**0.051** (0.000-0.213)	0.0012	0.1965	0.0013	0.1894
			TNFα/IFNγ	**0.000** (0.000-0.052)	**0.000** (0.000-0.096)	**0.059** (0.000-7.092)	0.0057	0.5479	0.0056	0.1935
			IL-2/IFNγ	**0.000** (0.000-0.026)	**0.000** (0.000-0.077)	**0.036** (0.000-1.164)	0.0080	0.6461	0.0086	0.1776
		CD8+	TNFα	**0.032** (0.000-0.844)	**0.485** (0.149-4.936)	**1.149** (0.000-10.714)	0.0003	0.0128	0.0009	0.2954
			IFNγ	**0.000** (0.000-0.042)	**0.000** (0.000-0.104)	**0.000** (0.000-3.407)	0.1218	-	-	-
			IL-2	**0.010** (0.000-0.058)	**0.003** (0.000-0.040)	**0.013** (0.000-0.036)	0.7995	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**0.000** (0.000-0.006)	**0.000** (0.000-0.023)	**0.009** (0.000-2.602)	0.0161	0.5725	0.0210	0.2611
			IL-2/IFNγ	**0.000** (0.000-0.009)	**0.000** (0.000-0.004)	**0.000** (0.000-0.411)	0.5121	-	-	-
	(Tube Mit)	CD4+	TNFα	**90.641** (41.112-177.240)	**66.351** (33.039-106.653)	**88.654** (41.877-162.707)	0.3914	-	-	-
			IFNγ	**5.762** (1.728-30.644)	**7.646** (2.904-14.483)	**9.167** (2.841-31.173)	0.1640	-	-	-
			IL-2	**1.949** (0.656-9.942)	**1.225** (0.814-3.318)	**1.130** (0.505-3.953)	0.1453	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**6.958** (1.603-26.436)	**7.793** (2.406-16.722)	**8.038** (2.909-33.044)	0.4825	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.853** (0.091-2.178)	**0.918** (0.258-19.916)	**0.726** (0.296-12.949)	0.9671	-	-	-
		CD8+	TNFα	**45.959** (14.544-68.945)	**30.517** (16.348-87.296)	**50.841** (12.165-87.174)	0.3704	-	-	-
			IFNγ	**4.904** (1.367-18.861)	**8.158** (4.154-24.938)	**10.653** (3.466-19.099)	0.3810	-	-	-
			IL-2	**0.349** (0.050-1.498)	**0.118** (0.000-0.455)	**0.276** (0.041-1.879)	0.2170	-	-	-
			TNFα/IFNγ	**5.708** (2.242-17.386)	**7.650** (0.723-22.274)	**9.538** (0.156-20.828)	0.6994	-	-	-
			IL-2/IFNγ	**0.527** (0.027-1.567)	**0.332** (0.149-3.371)	**0.415** (0.123-3.682)	0.9733	-	-	-

Flow TB assay – výsledky

Statisticky významné rozdíly mezi TB a TBI

Skupina	Cytokin	Populace	Stimulace	p-hodnota
🟦 Děti	*TNF-α*	*$CD8^+$*	*TB1*	*0,055*
🟦 Děti	TNF-α	$CD8^+$	TB2	0,038
🟩 Dospělí	IL-10	$CD4^+$	TB1	0,040
🟩 Dospělí	IL-10	$CD4^+$	TB2	0,002
🟩 Dospělí	IL-2	$CD4^+$	TB2	0,040
🟩 Dospělí	*TNF-α*	*$CD8^+$*	*TB1*	*0,052*

Porovnání imunokompromitovaných a imunokompetentních s TBI

🟥 Imunokompromitovaní	IL-2	$CD4^+$	TB1	0,018
🟥 Imunokompromitovaní	TNF-α	$CD4^+$	TB1	0,012
🟥 Imunokompromitovaní	TNF-α	$CD8^+$	TB1	0,008

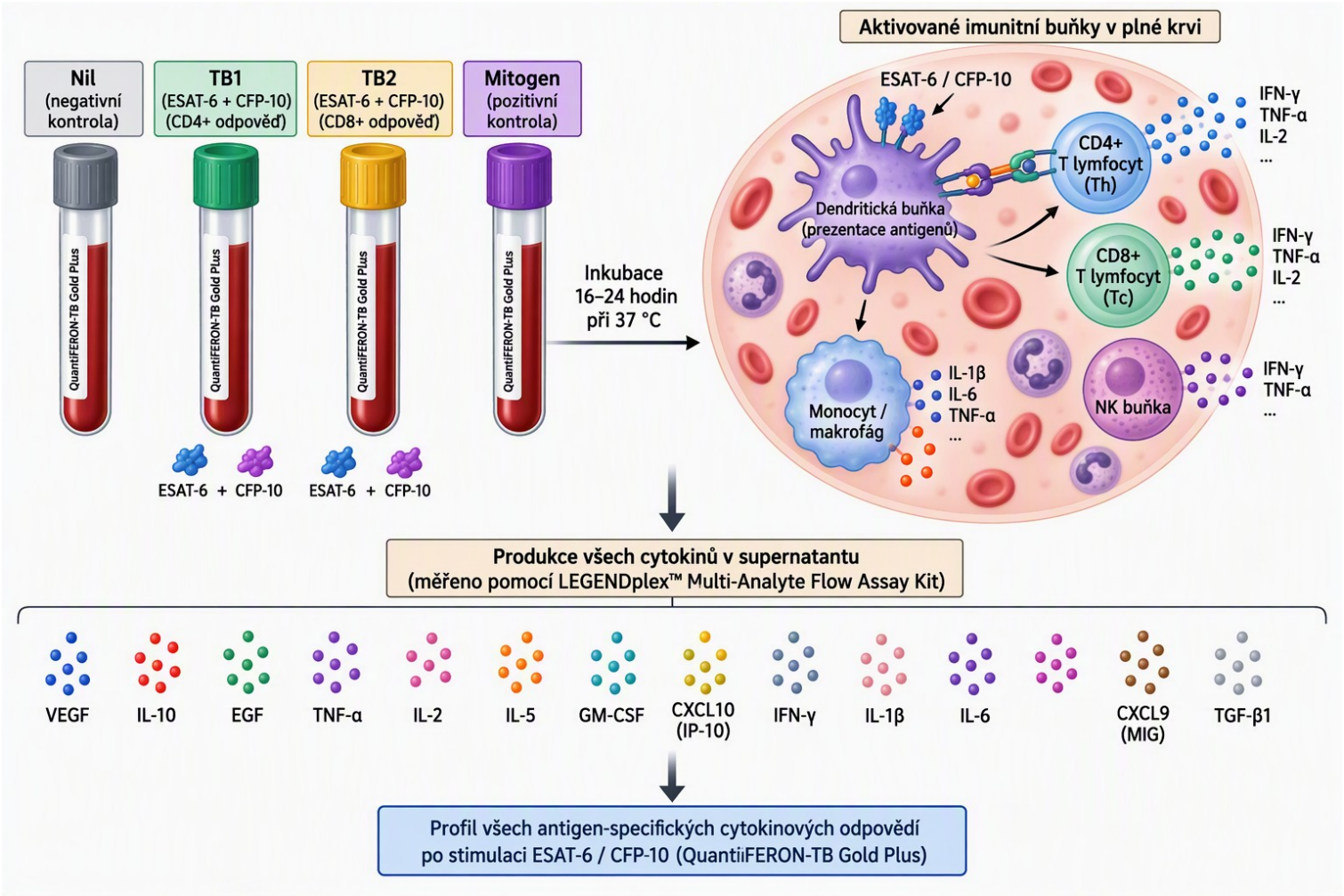
- Prokázána méně buněk s IL-2 a TNF-α oproti imunokompetentním dospělým.
- Výsledky potvrzují oslabenou antigenně specifickou imunitní odpověď.
- Interpretace je omezená malým počtem pacientů a absencí aktivní TB ve skupině.

Flow TB assay – závěry

- Neexistuje jeden univerzální cytokinový marker schopný spolehlivě odlišit TBI od TB.
- Rozlišovací markery jsou závislé na věku:
  - děti: **TNF-α v CD8+ T lymfocytech**
  - dospělí: **IL-10 a IL-2 v CD4+ T lymfocytech**
  - multivariabilní model poskytl podstatně lepší rozlišení u dospělých než jednotlivé cytokiny:
    - **AUC 0,730** (přijatelná diskriminační schopnost)
    - **senzitivita 92,9 %**
    - **specificita 52,4 %**
    - správná klasifikace **75,5 % pacientů**.

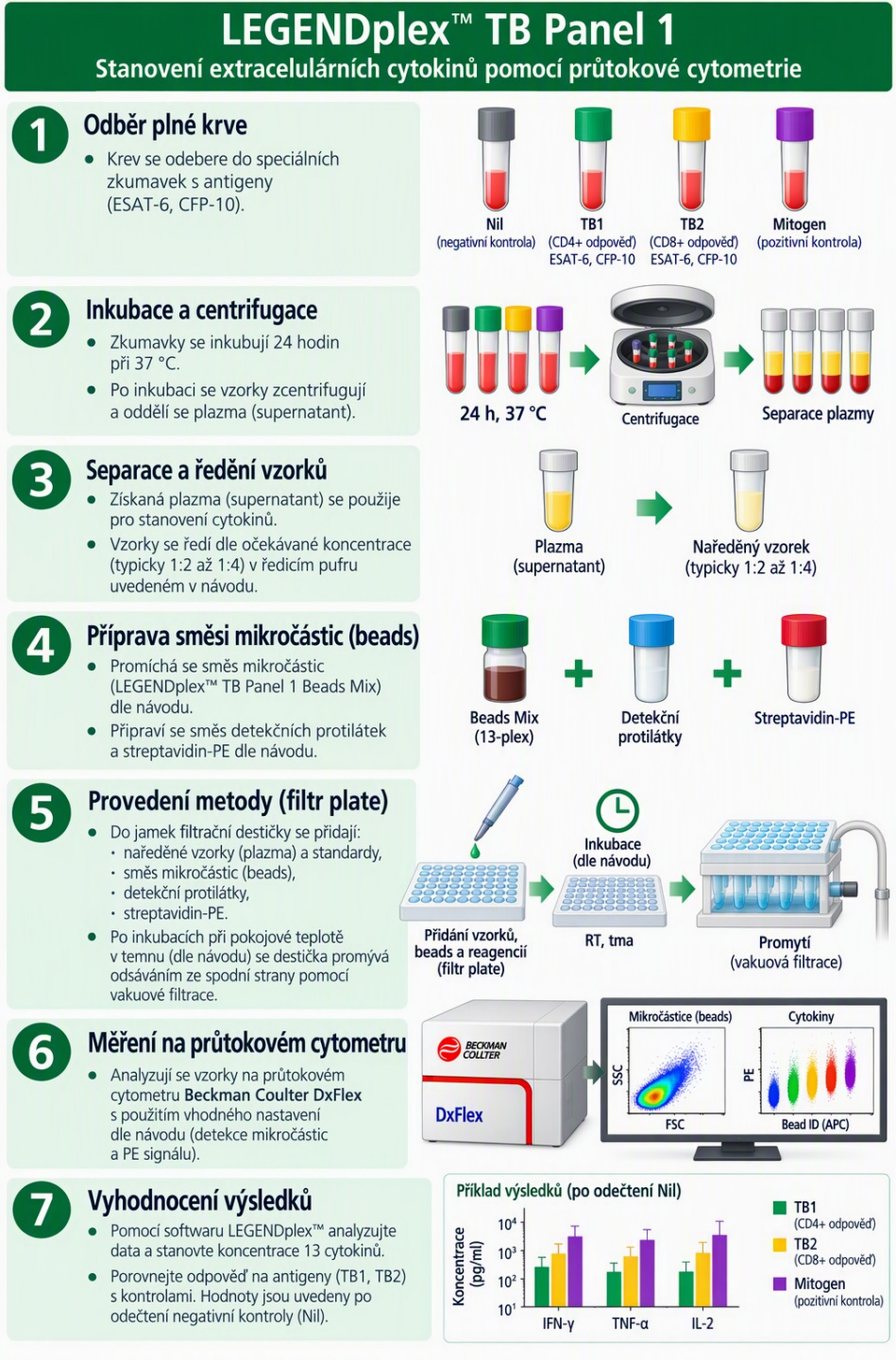
- Nutné je ověření na větších a různorodějších souborech pacientů.
- Výhoda testu: jednoduchý protokol, jen 1 ml periferní krve, průtokový cytometr a ….
- Flow TB assay představuje slibný doplněk ke stávajícím diagnostickým metodám.

LEGENDplex™ - Multi-Analyte Flow Assay Kit



Obrázek: MS Copilot Chat

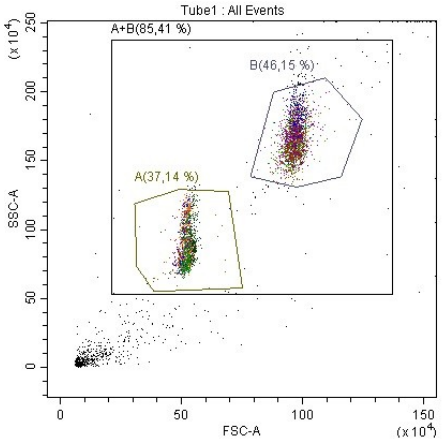
Metodika



Obrázky: MS Copilot Chat

Měření extracelulárních cytokinů

NK (NIL)

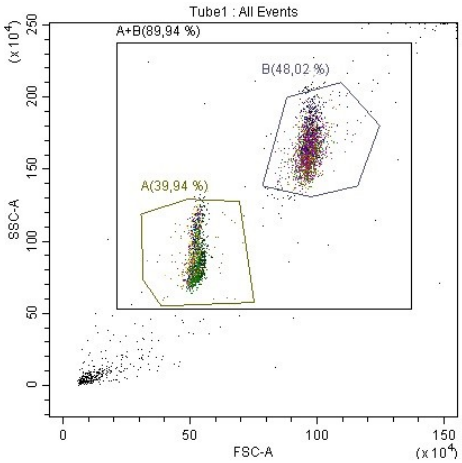


Tube Name: Tube1
Sample ID: Sample5

Population	Events	% Parent	Events/µL(V)	Median PE-A
A+B	3900	85,41 %	242,20	1565,8
VEGF	339	19,99 %	21,05	534,4
IL-10	264	15,57 %	16,40	470,6
EGF	269	15,86 %	16,71	5478,9
TNF-a	268	15,80 %	16,64	2218,4
IL-2	270	15,92 %	16,77	1166,2
IL-5	253	14,92 %	15,71	933,1
CXCL10 (IP-10)	289	13,72 %	17,95	19226,0
IFN-g	282	13,38 %	17,51	880,2
IL-1b	284	13,48 %	17,64	2203,0
IL-6	287	13,62 %	17,82	19465,9
CXCL9 (MIG)	297	14,10 %	18,44	9967,2
TGF-b1	333	15,80 %	20,68	1357,4
GM-CSF	307	14,57 %	19,07	874,5

NIL

PK (MIT)

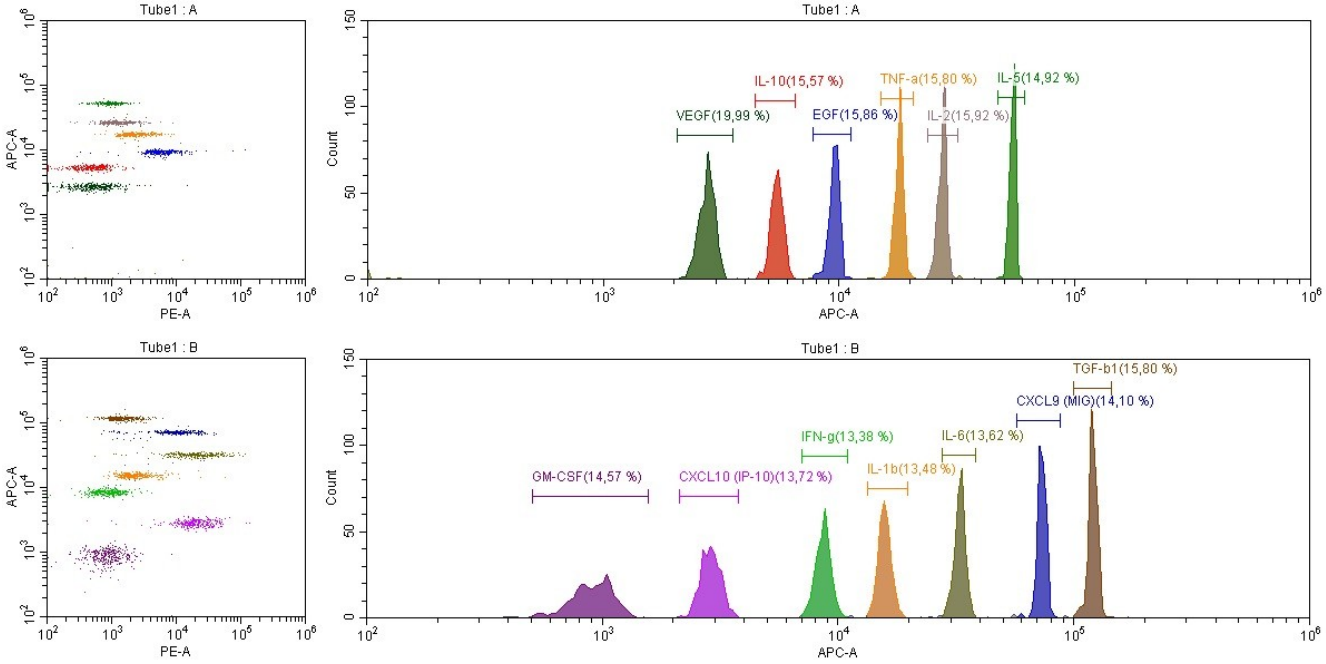


Tube Name: Tube1
Sample ID: Sample77

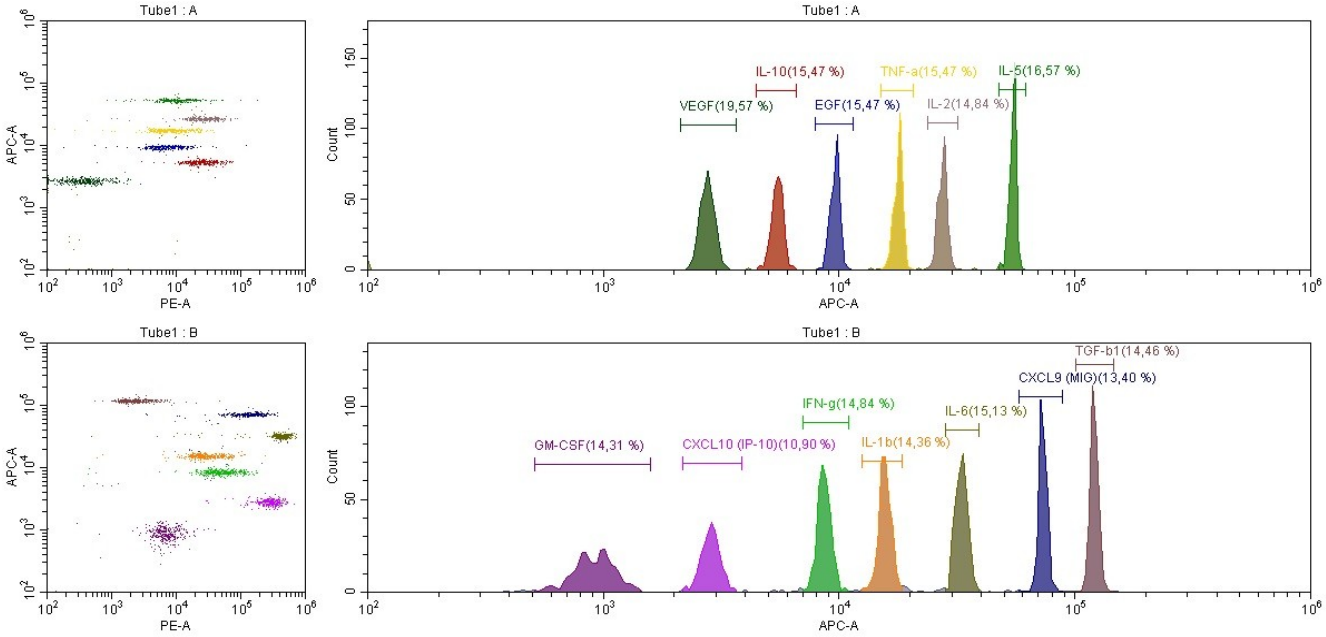
Population	Events	% Parent	Events/µL(V)	Median PE-A
A+B	3900	89,94 %	269,77	18007,3
VEGF	339	19,57 %	23,45	329,3
IL-10	268	15,47 %	18,54	22912,1
EGF	268	15,47 %	18,54	6205,3
TNF-a	268	15,47 %	18,54	7927,0
IL-2	257	14,84 %	17,78	25085,2
IL-5	287	16,57 %	19,85	10095,7
CXCL10 (IP-10)	227	10,90 %	15,70	281893,6
IFN-g	309	14,84 %	21,37	47684,2
IL-1b	299	14,36 %	20,68	26588,6
IL-6	315	15,13 %	21,79	429769,3
CXCL9 (MIG)	279	13,40 %	19,30	136248,4
TGF-b1	301	14,46 %	20,82	2182,3
GM-CSF	298	14,31 %	20,61	6708,6

MIT

NK (NIL)


Tube1 : A
APC-A
PE-A
Count
APC-A
VEGF(19,99 %)
IL-10(15,57 %)
EGF(15,86 %)
TNF-a(15,80 %)
IL-2(15,92 %)
IL-5(14,92 %)
Tube1 : B
GM-CSF(14,57 %)
CXCL10 (IP-10)(13,72 %)
IFN-g(13,38 %)
IL-1b(13,48 %)
IL-6(13,62 %)
CXCL9 (MIG)(14,10 %)
TGF-b1(15,80 %)

PK (MIT)


Tube1 : A
APC-A
PE-A
Count
APC-A
VEGF(19,57 %)
IL-10(15,47 %)
EGF(15,47 %)
TNF-a(15,47 %)
IL-2(14,84 %)
IL-5(16,57 %)
Tube1 : B
GM-CSF(14,31 %)
CXCL10 (IP-10)(10,90 %)
IFN-g(14,84 %)
IL-1b(14,36 %)
IL-6(15,13 %)
CXCL9 (MIG)(13,40 %)
TGF-b1(14,46 %)

Měření extracelulárních cytokinů



Predicted Concentration

Well	Sample Name	Dil	Repl	Specimen Type	VEGF (A3)	IL-10 (A4)	EGF (A5)	TNF-α (A6)	IL-2 (A7)	IL-5 (A10)	GM-CSF (B2)	CXCL10 (IP-10) (B3)	IFN-γ (B4)	IL-1β (B5)	IL-6 (B6)	CXCL9 (MIG) (B7)	TGF-β1 (B9)
[Sample1]Tube1.fcs	C0		1	Standard	~~<2.16~~	~~<0.24~~	~~<0.24~~	~~<0.80~~	~~<0.24~~	~~<4.35~~	~~<0.24~~	~~<0.24~~	~~<1.10~~	~~<0.89~~	~~<0.60~~	~~<5.268~~	~~<7.42~~
[Sample13]Tube1.fcs	C0		2	Standard	<2.16	<0.24	<0.24	<0.80	0.25	<4.35	<0.24	0.25	<1.10	<0.89	<0.60	<5.268	<7.42
[Sample25]Tube1.fcs	C1		1	Standard	7.82	2.50	2.12	2.14	2.27	4.86	2.62	2.15	2.47	2.73	2.48	<5.268	<7.42
[Sample37]Tube1.fcs	C1		2	Standard	4.31	2.85	3.08	2.51	2.61	5.53	2.93	2.52	2.53	2.80	2.75	<5.268	<7.42
[Sample49]Tube1.fcs	C2		1	Standard	25.96	9.22	12.91	10.95	9.75	20.29	9.71	10.02	10.96	10.04	9.14	5.992	20.10
[Sample61]Tube1.fcs	C2		2	Standard	25.75	8.82	8.20	10.59	9.27	18.65	8.94	10.72	9.84	9.89	9.25	7.915	20.94
[Sample73]Tube1.fcs	C3		1	Standard	98.15	41.52	37.45	41.01	51.67	88.02	38.27	41.87	41.44	42.44	44.56	22.983	87.11
[Sample85]Tube1.fcs	C3		2	Standard	86.81	34.72	32.15	32.67	32.37	64.76	34.13	33.06	31.07	30.77	33.63	18.925	58.80
[Sample2]Tube1.fcs	C4		1	Standard	459.46	185.47	184.54	182.26	180.48	384.82	169.58	181.52	181.54	180.13	175.55	116.820	374.50
[Sample14]Tube1.fcs	C4		2	Standard	360.82	151.90	147.65	134.99	125.02	276.79	163.98	142.53	141.44	147.17	148.56	114.821	288.33
[Sample26]Tube1.fcs	C5		1	Standard	1497.50	598.03	633.48	634.30	654.27	1293.62	666.86	643.32	654.51	623.76	638.22	471.964	1296.14
[Sample38]Tube1.fcs	C5		2	Standard	1546.87	686.33	658.93	676.65	605.36	1131.27	620.24	600.26	646.32	627.46	611.42	475.970	1209.57
[Sample50]Tube1.fcs	C6		1	Standard	6526.40	2413.21	2645.58	2803.39	2977.27	5584.93	2219.98	2434.99	2388.55	2449.31	2482.29	1609.454	4801.45
[Sample62]Tube1.fcs	C6		2	Standard	6090.94	2048.72	2002.24	1913.48	2303.32	4544.39	2404.48	2438.82	2337.23	2428.81	2370.67	1647.189	4839.00
[Sample74]Tube1.fcs	C7		1	Standard	23400.81	>10000.0	9694.12	9723.71	7896.00	19304.75	>10000.0	9671.34	9757.70	9588.36	9988.74	>7000.00	>20000.0
[Sample86]Tube1.fcs	C7		2	Standard	>25000.0	>10000.0	>10000.0	>10000.0	>10000.0	>20000.0	>10000.0	>10000.0	>10000.0	>10000.0	>10000.0	6809.156	>20000.0
[Sample3]Tube1.fcs	[Sample3]Tube1	1	1	Sample	76.90	6.40	101.71	75.55	3.30	9.48	18.84	43.63	25.97	193.74	2050.08	269.623	16.38
[Sample15]Tube1.fcs	[Sample15]Tube1	1	1	Sample	62.77	6.28	96.63	72.08	2.66	8.11	11.81	36.75	19.69	148.95	1941.60	258.909	11.99
[Sample27]Tube1.fcs	[Sample27]Tube1	1	1	Sample	141.20	5.37	170.44	83.58	2.86	7.61	14.48	40.31	23.91	77.60	1348.53	252.613	19.30
[Sample39]Tube1.fcs	[Sample39]Tube1	1	1	Sample	139.40	4.98	154.37	80.49	2.81	7.41	14.84	40.88	23.01	87.21	1351.38	286.389	20.15
[Sample51]Tube1.fcs	[Sample51]Tube1	1	1	Sample	73.96	4.74	118.66	69.87	3.46	10.61	15.38	41.15	24.12	76.35	1208.73	250.478	19.83
[Sample63]Tube1.fcs	[Sample63]Tube1	1	1	Sample	67.94	4.48	105.00	65.67	3.36	8.46	13.92	40.65	23.27	73.73	1112.33	254.360	13.92

Publikace, podpora

- Dolezalova K, Hadlova P, Ibrahimova M, Golias J, Baca L, Kopecka E, Sukholytka M, Koziar Vasakova M. Flow cytometry-based method using diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease. Tuberculosis (Edinb). 2024 Jul;147:102518.

- Doležalová K, Goliáš J, Ibrahimová M, Bača L, Kopecká E, Hriciková I, Rajnochová-Bloudíčková S, Philipp T, Koziar Vašáková M. Refining cytokine signatures: flow cytometry–based differentiation between TB infection and disease. IJTLD Open 3(7): 421-427, Jul 2026.

Flow TB assay byl zapsán užitný vzor č. 39387 a ochranná známka u ÚPV.

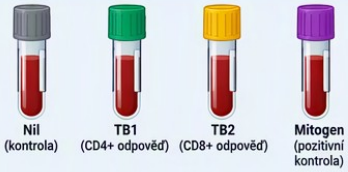
Studie byla podpořena z programového projektu MZ ČR – RVO (Fakultní Thomayerova nemocnice – FTN, 00064190) a z programu Cooperatio, poskytovaného Univerzitou Karlovou, vědní oblast Internal Disciplines, řešeného na Pneumologické klinice 1. LF UK a FTN.



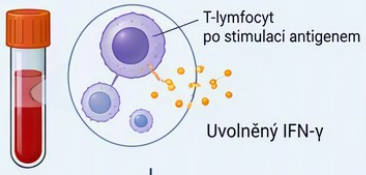
TBI – laboratorní imunologické testy

QuantiFERON-TB Gold Plus
(IGRA – metoda ELISA)

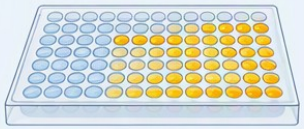
1 Odběr plné krve
Krev se odebere do speciálních zkumavek s antigenty (ESAT-6, CFP-10).



2 Inkubace
Plná krev se inkubuje s antigeny. Pokud jsou přítomny paměťové T-lymfocyty specifické pro *M. tuberculosis*, uvolní interferon-γ (IFN-γ) do plazmy.



3 Stanovení IFN-γ metodou ELISA
Z plazmy se změří koncentrace IFN-γ (imunoenzymatická metoda ELISA).



4 Výsledek
Kvantitativní koncentrace IFN-γ (IU/ml) pro jednotlivé zkumavky (TB1, TB2, Nil, Mitogen).
Interpretace: pozitivní / negativní / neurčitý.

Výsledek (příklad)
Nil: 0,04 IU/ml
TB1: 1,23 IU/ml
TB2: 0,98 IU/ml
Mitogen: 5,12 IU/ml
Interpretace: pozitivní

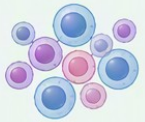
Hlavní charakteristiky
- Metoda: **ELISA** (měří množství IFN-γ)
- Vyšetřuje se plná krev
- Dva antigenní stimuly (TB1 – převážně CD4+, TB2 – i CD8+)
- Výsledek je kvantitativní (IU/ml)
- Interpretace: pozitivní / negativní / neurčitý

T-SPOT.TB
(IGRA – metoda ELISpot)

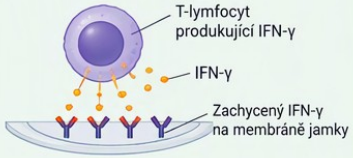
1 Odběr krve
Krev se odebere do standardní zkumavky (s heparinem).



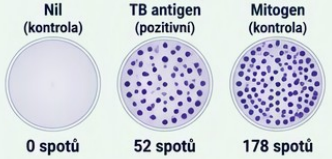
2 Izolace mononukléárních buněk (PBMC)
Z krve se izolují mononukleární buňky periferní krve (PBMC) (centrifugace, separace).



3 Inkubace buněk s antigeny
Definovaný počet PBMC se inkubuje v jamkách s antigeny (ESAT-6, CFP-10). T-lymfocyty produkující IFN-γ vytvoří na membráně jamky viditelné „spoty".



4 Detekce a vyhodnocení (ELISpot)
Po inkubaci se spoty zobrazí enzymatickou reakcí a automaticky se spočítají.



5 Výsledek
Počet IFN-γ produkujících buněk (spot-forming cells, SFC) na 250 000 PBMC.
Interpretace: pozitivní / negativní / neurčitý.

Výsledek (příklad)
Nil: 0 SFC
TB antigen: 52 SFC
Mitogen: 178 SFC
Interpretace: pozitivní

Hlavní charakteristiky
- Metoda: ELISpot (měří počet buněk produkujících IFN-γ)
- Z krve se izolují PBMC
- Využívá pevný počet buněk (obvykle 250 000 PBMC/jamku)
- Výsledek je počet spotů (SFC)
- Interpretace: pozitivní / negativní / neurčitý

Obrázky: MS Copilot Chat

Tuberkulóza – historie

- 6 000 př.n.l. – nález TB v kosterních ostatcích, jedno z nejstarší historicky doložitelných onemocnění
- 460-370 př.n.l. Hippokrates – termín phthisis = souchotiny, úbytě; kniha O epidemiích – první přesný klinický popis TB (vykašlávání krve, vleklou horečku, těžké noční pocení a extrémní ztrátu tělesné hmotnosti)
- 1679 Sylvius - považuje tuberkuly (uzlíky v plicích) za skutečné původce ftízy
- 1800 „bílá smrt“ – TB příčinou ¼ všech úmrtí v Evropě
- 1810 Bayle - učí, že tuberkuly jsou specifická lokální formace způsobující specifickou nemoc.
- 1815 Laënnec - objeví stetoskop a zavede moderní fyzikální diagnostiku
- 1839 Schönlein – sjednotil terminologii a zavedl název onemocnění tuberkulóza
- 1859 Brehmer - zahajuje moderní institucionální léčbu tuberkulózy
- 1865 Villemin - experimentálně prokazuje, že tuberkulóza je specifická infekce
- 1882 Koch – objevuj Kochova bacilu (bakterii *Mycobacterium tuberculosis*) – NP 1905
- 1890 Koch – představil tuberkulin, glycerinový extrakt tuberkulinového extraktu
- 1895 Roentgen – objevil x-paprsky
- 1907 Pirquet – představil kožní test pro dg tuberkulózy
- 1921 Calmette a Guérin – poprvé použili vakcínu BCG, jediná dodnes
- 1943 Waksman – objevil streptomycin, první ATB pro léčbu TB, ale velmi brzká rezistence – NP 1952

A Historical Chronology of Tuberculosis. *JAMA*. 1939;112(4):361.

Tuberkulóza – slavné osobnosti

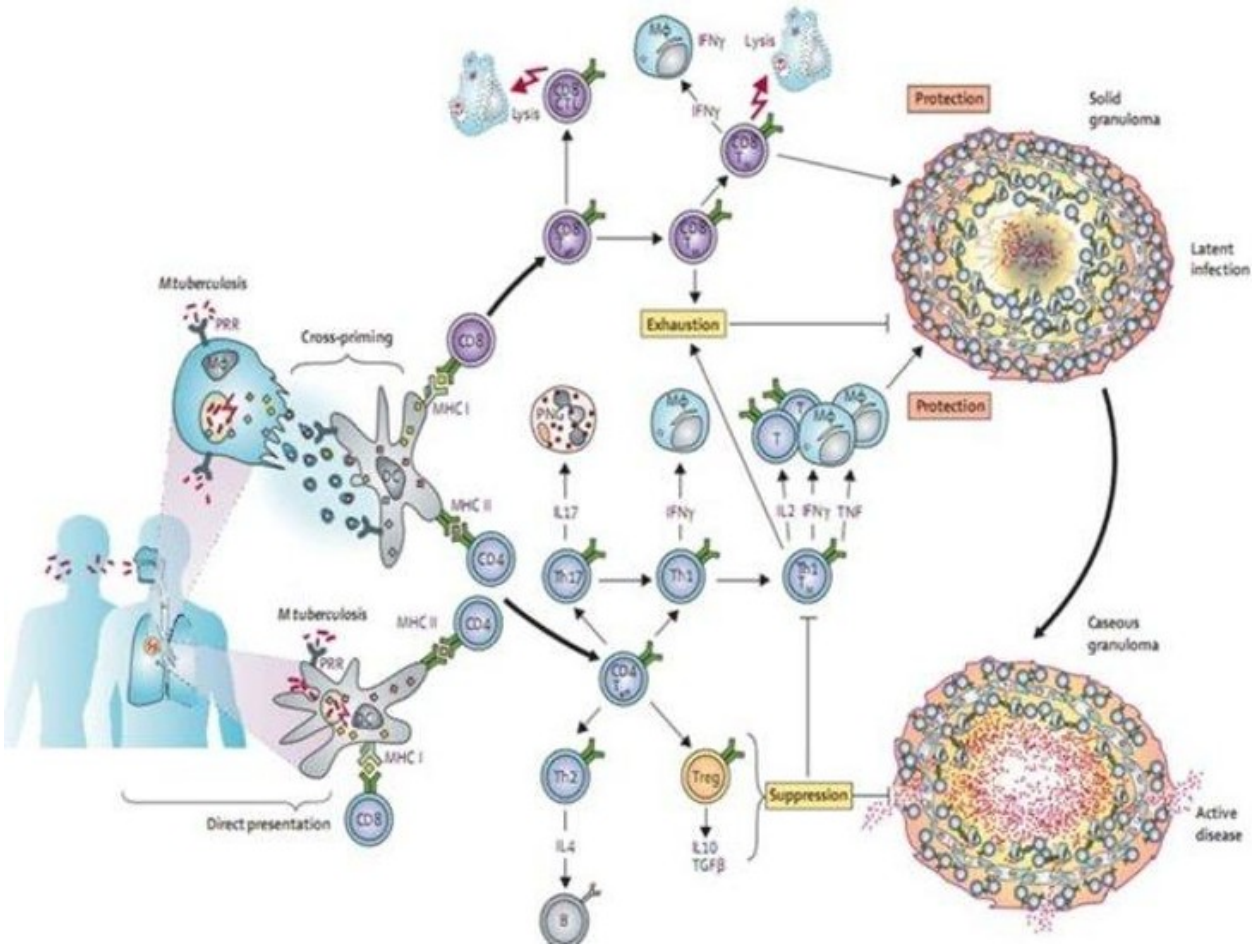
- **Franz Kafka** (1883–1924) – Jeden z nejvlivnějších spisovatelů 20. století podlehl tuberkulóze hrtanu v sanatoriu v rakouském Kierlingu. [1, 2]
- **George Orwell** (1903–1950) – Britský autor kultovních románů 1984 a Farma zvířat bojoval s TBC dlouhá léta a zemřel na ni v Londýně. [1, 2]
- **Anton Pavlovič Čechov** (1860–1904) – Slavný ruský dramatik a spisovatel byl sám lékařem, takže postup své nemoci dokázal přesně sledovat. [1, 2]
- John Keats (1795–1821) – Jeden z hlavních představitelů anglického romantismu zemřel v Římě v pouhých 25 letech. [1, 2]
- Sestry Brontëovy – Tato literárně mimořádně nadaná rodina byla TBC doslova zdecimována. Zemřela na ni **Emily Brontëová** (autorka Na Větrné hůrce v roce 1848), její sestra Anne (1849) i jejich bratr Branwell (1848). [1, 2]
- **Amedeo Modigliani** (1884–1920) – Italský malíř a sochař proslulý svými portréty s charakteristicky protáhlými obličeji. Žil bohémským životem v Paříži, což jeho zdraví oslabené tuberkulózní meningitidou ještě zhoršilo.
- Aubrey Beardsley (1872–1898) – Geniální anglický secesní ilustrátor a přední představitel dekadence zemřel na TBC v pouhých 25 letech.
- Frédéric-Auguste Bartholdi (1834–1904) – Francouzský sochař, který navrhl slavnou Sochu svobody v New Yorku. [1, 2, 3, 4]
- **Frédéric Chopin** (1810–1849) – Slavný polský klavírní virtuos a skladatel trpěl plicní chorobou většinu svého dospělého života a zemřel v Paříži ve věku 39 let. [1]
- **Carl Maria von Weber** (1786–1826) – Německý skladatel a průkopník romantické opery (Čarostřelec) podlehl nemoci během svého pobytu v Londýně. [1]
- Giovanni Battista Pergolesi (1710–1736) – Italský barokní skladatel, autor slavného díla Stabat Mater, zemřel v pouhých 26 letech. [1, 2]
- **Karel Havlíček Borovský** (1821–1856) – Významný český spisovatel, novinář a satirik.
- **Jiří Wolker** (1900–1924) – Talentovaný básník, který svou těžkou nemoc a loučení se životem emotivně popsal ve svých básních i ve vlastním epitafu. Zemřel ve 23 letech.
- Karel Hlaváček (1874–1898) – Význačný český dekadentní básník a výtvarník zemřel na TBC ve věku 23 let. [1, 2]

odkazy

výsledky

Pacienti	Cytokiny	Populace	Stimulace	TBI (median [Q1–Q3])	TB (median [Q1–Q3])	p-value
Děti	**IL-10**	**CD4⁺**	TB1	0.0 [0.0–0.0]	0.0 [0.0–0.0]	0.478
		CD4⁺	TB2	0.0 [0.0–2271.5]	0.0 [0.0–0.0]	0.483
		CD8⁺	TB1	635.8 [0.0-4938.8]	660.0 [172.4-5378.0]	0.825
		CD8⁺	TB2	385.6 [0.0-21166.0]	2514.4 [1526.0-7103.3]	0.509
	IL-2	**CD4⁺**	TB1	131.7 [0.0-530.6]	269.6 [85.2-666.2]	0.155
		CD4⁺	TB2	155.4 [0.0-383.6]	425.2 [71.6-895.5]	0.080
		CD8⁺	TB1	0.0 [0.0-331.4]	167.1 [0.0-378.0]	0.379
		CD8⁺	TB2	137.2 [0.0-403.2]	131.4 [0.0-240.8]	0.796
	TNF-α	**CD4⁺**	TB1	11632.8 [2620.8-35120.4]	25359.5 [11373.0-39495.9]	0.174
		CD4⁺	TB2	11629.1 [1844.5-30782.4]	27439.8 [10454.5-42844.3]	0.073
		CD8⁺	TB1	1761.2 [0.0-11278.8]	11218.9 [1696.5-27820.8]	**0.055**
		CD8⁺	TB2	2227.4 [600.0–12831.6]	12765.2 [5861.5–37720.8]	0.038
	IFN-g	**CD4⁺**	TB1	186.8 [0.0-658.4]	259.0 [0.0-850.4]	0.643
		CD4⁺	TB2	0.0 [0.0-177.6]	180.2 [0.0-704.7]	0.060
		CD8⁺	TB1	0.0 [0.0-331.4]	33.6 [0.0-270.0]	0.893
		CD8⁺	TB2	0.0 [0.0-98.8]	0.0 [0.0-285.0]	0.637
Dospělí	**IL-10**	**CD4⁺**	TB1	0.0 [0.0–870.7]	0.0 [0.0–0.0]	0.040
		CD4⁺	TB2	403.9 [0.0–1229.5]	0.0 [0.0–0.0]	0.002
		CD8⁺	TB1	4037.0 [256.3-10279.3]	371.2 [31.4-729.6]	0.100
		CD8⁺	TB2	3080 [183.2-8922.2]	561.0 [0.0-954.8]	0.148
	IL-2	**CD4⁺**	TB1	0.0 [0.0-160.9]	59.6 [0.0-307.4]	0.376
		CD4⁺	TB2	0.0 [0.0-70.2]	104.4 [22.7-390.6]	0.040
		CD8⁺	TB1	23.3 [0.0-209.2]	95.5 [0.0-401.8]	0.303
		CD8⁺	TB2	23.3 [0.0-156.9]	234.3 [0.0-606.6]	0.107
	TNF-α	**CD4⁺**	TB1	13363.5 [743.4-47446.5]	20739.1 [0.0-54542.6]	0.646
		CD4⁺	TB2	211.5 [0.0-27662.4]	646.8 [0.0-14979.8]	0.659
		CD8⁺	TB1	2296.8 [0.0-20920.0]	13775.0 [781.4-62454.2]	**0.052**
		CD8⁺	TB2	0.0 [0.0-18148.1]	3562.4 [0.0-18115.7]	0.267
	IFN-g	**CD4⁺**	TB1	90.6 [0.0-286.8]	37.5 [0.0-221.3]	0.278
		CD4⁺	TB2	197.7 [0.0-459.0]	0.0 [0.0-225.2]	0.190
		CD8⁺	TB1	36.7 [0.0-146.1]	10.3 [0.0-123.1]	0.757
		CD8⁺	TB2	34.0 [0.0-203.0]	30.8 [0.0-148.9]	0.933
				Immunocompromised (median [Q1–Q3])	Immunocompetent (median [Q1–Q3])	
Imunodeficience	**IL-10**	**CD4⁺**	TB1	354.0 (0.0-2482.0)	639.2 (15.2-4227.8)	0.580
		CD4⁺	TB2	708.0 (153.0-8386.0)	1256.4 (0.0-2956.5)	0.871
		CD8⁺	TB1	16.0 (0.0-178.0)	19.0 (0.0-67.7)	0.946
		CD8⁺	TB2	48.0 (0.0-150.5)	30.4 (0.0-159,0)	0.843
	IL-2	**CD4⁺**	TB1	0.0 (0.0-0.0)	44.9 (0.0-224.6)	0.018
		CD4⁺	TB2	70.0 (0.0-203.0)	53.2 (0.0-375.6)	0,648
		CD8⁺	TB1	173.5 (135.0-193.5)	82.6 (0.0-334.4)	0.303
		CD8⁺	TB2	87.5 (0.0-161.3)	114.6 (0.0-495.6)	0.499
	TNF-α	**CD4⁺**	TB1	0.0 (0.0-801.0)	17377.2 (0.0-51306.4)	0.012
		CD4⁺	TB2	0.0 (0.0-1648.5)	211.5 (0.0-18669.0)	0.258
		CD8⁺	TB1	0.0 (0.0-110.0)	8242.0 (0.0-36932.6)	**0.008**
		CD8⁺	TB2	0.0 (0.0-1976.0)	1017.9 (0.0-18148.1)	0.113
	IFN-g	**CD4⁺**	TB1	102.0 (0.0-313.0)	83.9 (0.0-236.1)	0.834
		CD4⁺	TB2	0.0 (0.0-371.5)	44.9 (0.0-265.2)	0.758
		CD8⁺	TB1	0.0 (0.0-88.0)	35.8 (0.0-131.6)	0.432
		CD8⁺	TB2	0.0 (0.0-187.0)	32.3 (0.0-203.0)	0.465

Role cytokinů v TB a TBI



Immune response against Mycobacterium tuberculosis (Use of image with permission of the author Resti Yudhawati, CC BY-NC-SA 4.0)

Tuberkulóza – M. tuberculosis komplex

- Netuberkulózní mykobacteria (**NTM**) - enviromentální: M. kansasii, M. marinum, M. szulgai, M. flavescens, M. gordonae

- **Mbt komplex**: M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. canetti

- **TST**, který se provádí technikou podle Mantouxe, purifikovaný proteinový derivát (PPD), hypersenzitivní reakce pozdního typu dostavuje během 48 až 72 hodin

- **BCG**: My. bovis (bacillus Calmette-Guérin, BCG)

- **QF**: ESAT a CFP obsaženy v M. tuberculosis, M. marinum, M. kansasii, M. szulgai a M. flavescens; zkřížená reakce s M. leprae?

zkumavky na antigen TBC 1 (TB1) a zkumavku na antigen TBC 2 (TB2). Obě zkumavky obsahují peptidové antigeny z antigenů asociovaných s komplexem MTB, ESAT-6 a CFP-10, které jsou určeny k vyvolání buněčně zprostředkovaných imunitních odpovědí u pomocných CD4+ T lymfocytů. Zkumavka TB2 obsahuje dodatečnou soupravu peptidů zaměřených na vyvolání odpovědí CMI u CD8+ cytotoxických T lymfocytů.

- **T-spot**: ESAT a CFP obsaženy v M. tuberculosis, M. kansasii, M. szulgai, M. marinum a M. gordonae

TB specifické antigeny – panel A (ESAT-6) a panel B (CFP10) = 2 zkumavky

odkazy